

University of Groningen

## Application of a glutamate microsensor to brain tissue

Oldenziel, Weite Hendrik

**IMPORTANT NOTE:** You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

*Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*

2006

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

Oldenziel, W. H. (2006). *Application of a glutamate microsensor to brain tissue*. s.n.

### Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

### Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

### 10.3 Nederlandse Samenvatting

Microsensoren die neurotransmitters kunnen detecteren vormen een veelbelovende nieuwe analyse techniek voor het bestuderen van neuronale processen in de hersenen van proefdieren. Microsensoren zijn namelijk in staat om in nabijheid van cellulaire activiteit de afgifte van neurotransmitters in de orde van seconden te meten, terwijl ze maar weinig weefsel schade veroorzaken. Dergelijk onderzoek kan bijdragen tot een beter begrip van de fysiologie van de hersenen, dat vervolgens kan resulteren tot meer inzicht in de pathofysiologie van tal van psychische, neuronale en neurodegeneratieve aandoeningen.

Sinds ongeveer vijftien jaar wordt er onderzoek gedaan naar de ontwikkeling van microsensoren die gebruikt kunnen worden om het aminozuur l-glutamaat te meten in de hersenen van proefdieren. Verschillende typen glutamaat microsensoren zijn ontwikkeld. Een veelbelovend type microsensor is de hydrogel-gecoate sensor. Het onderzoek in dit proefschrift beschrijft de constructie, evaluatie en praktische toepassing van dit type microsensor.

#### **Rol van glutamaat in het centrale zenuwstelsel**

Het aminozuur l-glutamaat is een van de belangrijkste neurotransmitters in het centrale zenuwstelsel (CZS). Ongeveer 50% van alle neuronen in het CZS gebruikt glutamaat als neurotransmitter, terwijl vrijwel alle neuronen gevoeligheid vertonen voor dit aminozuur. Glutamaat is daardoor betrokken bij vele fysiologische processen, zoals de plasticiteit en ontwikkeling van het CZS, de vorming en vastlegging van geheugen, de doorbloeding van de hersenen, etc. Dit is tevens de reden waarom glutamaat betrokken is bij vele pathofysiologische processen, zoals epilepsie, schizofrenie, depressie, de ziekte van Parkinson, de ziekte van Alzheimer, amyotrofe laterale sclerose en herseninfarcten.

Naast zijn functie als neurotransmitter heeft glutamaat nog tal van andere functies in het CZS. Zo speelt het een belangrijke rol in de energiehuishouding van de hersenen, in de detoxificatie van bepaalde stoffen en is het een belangrijke bouwsteen in de synthese van tal van eiwitten en peptiden, onder andere van het antioxidant glutathion. Bovendien is glutamaat een directe precursor van een andere zeer belangrijke neurotransmitter, namelijk GABA ( $\gamma$ -aminoboterzuur). Ongeveer 20 % van alle neuronen in het CZS gebruikt GABA als neurotransmitter. Glutamaat en GABA worden dan ook beschouwd als de primaire neurotransmitters in het CZS. Hierbij vervult glutamaat voornamelijk een exciterende rol, terwijl GABA hoofdzakelijk inhibitorisch werkt.

### **Detectie van glutamaat in de hersenen**

Doordat glutamaat een belangrijke rol speelt bij tal van fysiologische en pathofysiologische processen in het CZS, is het een belangrijk doelwit voor wetenschappelijk onderzoek. Tevens dienen glutamaat analoga als doelwit voor de ontwikkeling van nieuwe medicijnen voor enkele van bovengenoemde aandoeningen. Er is echter nog relatief weinig bekend over hoe glutamaterge neurotransmissie in het CZS is gereguleerd. De afgelopen jaren is bijvoorbeeld gebleken dat de fysiologie van deze neurotransmissie veel complexer is dan die van de “meer klassieke” neurotransmitters, zoals dopamine, noradrenaline, acetylcholine en serotonine. Ter illustratie, het is pas sedert de laatste 5 jaar dat een cruciale rol voor astrocyten in de regulatie van glutamaterge neurotransmissie wordt onderkend. Debet hieraan is hoogstwaarschijnlijk de multifunctionele rol die glutamaat in het CZS vervult. De tot nu toe gebruikte analyse technieken blijken namelijk niet te kunnen onderscheiden tussen glutamaat afkomstig van neuronale oorsprong en van andere oorsprong. Voor een beter begrip van glutamaterge neurotransmissie is het meten van glutamaat uit neurotransmissie dan ook van groot belang.

Tot nu toe is de microdialyse techniek verreweg de meest gebruikte techniek voor het direct meten van extracellulaire glutamaat in de hersenen. De basis van deze techniek berust op het principe van dialyse. Middels een canule die bestaat uit een buisje met daar omheen een membraan worden monsters genomen van de extracellulaire hersenvloeistof. Microdialyse blijkt een goede analyse techniek om inzicht te krijgen in het werkingsmechanisme van tal van neurotransmitters, zoals de eerder genoemde dopamine, noradrenaline, acetylcholine en serotonine. Voor het meten van glutamaat, maar ook andere stoffen zoals GABA, wordt echter getwijfeld aan de waarde van de microdialyse techniek. Deze twijfel is onder andere geuit in enkele kritische artikelen die zijn gepubliceerd eind jaren tachtig en in de jaren negentig door onze onderzoeksgroep, maar ook door andere groepen. De laatste jaren blijken de critici van het eerste uur meer aanhang te krijgen en neemt het aantal artikelen toe waarin openlijk wordt getwijfeld aan de oorsprong van glutamaat gemeten met microdialyse. Het blijkt dat glutamaat in microdialyse monsters niet reageert op een tweetal klassieke criteria die gelden voor neuronale afgifte van een neurotransmitter, te weten calcium afhankelijkheid en respons op blokkade van natrium kanalen.

Hoogstwaarschijnlijk is de microdialyse techniek niet in staat om (basale waarden van) glutamaat afkomstig van neuronale processen te meten omdat de methode een aantal beperkingen kent. Dit geldt met name voor de spatiële- en temporele resolutie van de techniek. De spatiële resolutie heeft betrekking op de dimensies van de microdialyse canule (een diameter van 300 tot 500  $\mu\text{m}$ ). Deze relatief grote afmetingen veroorzaakt nogal wat weefschade in de hersenen waardoor de fysiologie wordt verstoord en daarmee de detectie van glutamaat afkomstig van fysiologische processen. Dit betekent dat glutamaat

sensoren ontwikkelt, ieder met specifieke voor- en nadelen. Naast beïnvloeding van de selectiviteit en gevoeligheid van de sensor wordt het praktische gebruik van de microsensor ook beperkt door tal van andere factoren, zoals biovervuiling, stabiliteitsproblemen, zuurstofafhankelijkheid, etc.

### **Hydrogel-gecoate glutamaat microsensoren**

Eind jaren '90 werd een veelbelovende microsensor gepresenteerd door Kulagina et al. (1999). Dit betrof een hydrogel-gecoate microsensor. Deze sensor bestaat uit een 10 micrometer diameter koolstof fiber elektrode, die gecoat is met een hydrogel. De hydrogel bestaat uit een drietal enzymen (glutamaat oxidase, horseradish peroxidase en ascorbaat oxidase), die door middel van een crosslinker (polyethyleenglycol (diglycidylether)) zijn gekoppeld aan een osmium bevattend redox polymeer. Met behulp van een ingewikkelde elektrochemische cascade wordt de concentratie glutamaat gedetecteerd als stroom (uitgedrukt in picoamperes). Uit deze publicatie bleek onder andere dat dit type microsensor in staat was tetrodotoxine (TTX) afhankelijke glutamaat te meten (N.B. TTX is een blokker van natriumkanalen). Dit vormde de directe aanleiding voor het onderwerp van het onderzoek beschreven in dit proefschrift: de introductie van deze specifieke microsensor en het routinematige gebruik ervan als analytische techniek. In praktijk bleek de introductie toch minder eenvoudig als in eerste instantie gedacht, met name doordat veel fundamentele aspecten van de sensor nog niet waren uitgezocht. De consequentie hiervan was dat het proces van introductie tot praktische toepassing een stapsgewijze benadering vereiste, waarbij elke stap fundamenteel uitgezocht diende te worden. Als zodanig kan het proefschrift opgedeeld worden in drie delen, waarbij respectievelijk de fabricage, evaluatie en praktische toepassing van deze specifieke glutamaat microsensor wordt behandeld.

### **Indeling proefschrift**

Het proefschrift is opgedeeld in verschillende hoofdstukken. Het **eerste hoofdstuk** is een algemene introductie. Hierin wordt voornamelijk aandacht besteed aan de twee pijlers van dit proefschrift: biosensoren en de rol van glutamaat als neurotransmitter. Met betrekking tot biosensoren wordt aan verschillende aspecten aandacht geschonken, onder andere aan de methodiek, commercialisatie en verschillende generaties biosensoren en de bijhorende voor- en nadelen. In de tweede paragraaf wordt nader ingegaan op de hydrogel-gecoate microsensor: het ontwerp, het werkingsprincipe, de specificaties, de specifieke voor- en nadelen, etc. Tevens wordt de motivatie tot introductie van deze specifieke microsensor besproken. Hierin wordt onder andere ook een vergelijking gemaakt met de microdialyse techniek. In de derde paragraaf wordt de fysiologie van glutamaat in de hersenen besproken.

Aan de orde komen welke functies glutamaat vervult in de hersenen, de specifieke rol van glutamaat als neurotransmitter, de regulatie van glutamaterge neurotransmissie, etc. Tevens wordt aandacht geschonken aan de meest recente inzichten met betrekking tot de rol van astrocyten in glutamaterge neurotransmissie. In de vierde paragraaf wordt vervolgens de introductie kort samengevat en wordt de opzet van het proefschrift besproken.

Het reproduceerbaar maken van de microsensor bleek één van de moeilijkste aspecten. Daarom is hier veel aandacht aan besteed in de eerste hoofdstukken (hoofdstuk 2 t/m 4). In **hoofdstuk 2** zijn de diverse individuele stappen in de constructie van de microsensor nader bestudeerd. Het bleek dat de applicatie van de hydrogel de meest cruciale stap was in het bepalen van de uiteindelijke analytische eigenschappen van de microsensor. Tevens bleek dat de fysische omstandigheden tijdens het coaten van de hydrogel op de carbon fiber elektrode cruciaal waren. Dit heeft geleid tot de ontwikkeling van een automatische dipcoater. Deze dipcoater bood de mogelijkheid tot controle en standaardisatie van de fysieke en fysische omstandigheden tijdens het dipcoat proces, waardoor zowel de reproduceerbaarheid als de specificaties van de sensor significant verbeterden. Tevens bood de dipcoater de mogelijkheid om het dipcoat proces te combineren met diverse andere crosslink methodes om als zodanig het polymerisatie proces te verbeteren en in detail te volgen. Dit laatste werd gedaan door het dipcoat proces te combineren met amperometrie en de toegenomen weerstand van de microsensor als maat voor een groeiende laagdikte te beschouwen. In dit hoofdstuk werd tevens waargenomen dat kleine veranderingen in de samenstelling van de hydrogel de uiteindelijke kwaliteit van de microsensor drastisch konden beïnvloeden.

Dit laatste gegeven was aanleiding om in **hoofdstuk 3** de invloed van de verschillende hydrogel-componenten op de uiteindelijke aspecten van de microsensor nader te onderzoeken. Het bleek dat een uitgebalanceerde samenstelling van de verschillende hydrogel-componenten de uiteindelijk eigenschappen van de microsensor kon optimaliseren. Hierbij kwam naar voren dat de balans tussen de hoeveelheid osmium redox-polymeer en de totale hoeveelheid enzymen, als ook de balans tussen de drie individuele enzymen van cruciaal belang was. Tevens werd waargenomen dat verschillende batches ascorbaat oxidase de kwaliteit van de sensor aanzienlijk beïnvloeden. Dit werd ervaren als een handicap in het praktische gebruik van de sensor. Telkens als er namelijk een nieuwe batch ascorbaat oxidase werd gebruikt, bleek deze de eigenschappen van de sensor significant te beïnvloeden.

Dit gegeven vormde de aanleiding om in **hoofdstuk 4** de invloed van de eigenschappen van ascorbaat oxidase op de uiteindelijke kwaliteit van de sensor verder te onderzoeken. Het bleek dat de verschillende batches ascorbaat oxidase wat betreft de hoeveelheid eiwit, zouten en stabilisator aanzienlijk verschilden. Blijkbaar zorgde dit voor

variatie in de hoeveelheid ascorbaat oxidase die uiteindelijk in de hydrogel werd opgenomen. Een simpele opzuiveringsstap bleek uitkomst te bieden. Door de verschillende batches te filteren en gestandaardiseerde hoeveelheden zout en stabilisator toe te voegen bleek het mogelijk de incorporatie van ascorbaat oxidase in de hydrogel te standaardiseren.

Na deze 3 hoofdstukken bleek het mogelijk om microsensoren te maken met, tot op zekere hoogte, reproduceerbare analytische specificaties. Echter voordat de microsensor routinematig als analyse techniek gebruikt kon worden was een uitgebreide karakterisatie en evaluatie vereist. Daarom is in **hoofdstuk 5** de microsensor uitvoerig geëvalueerd. Er is aandacht geschonken aan tal van aspecten die de microsensor kunnen beïnvloeden wanneer deze rechtstreeks in de hersenen wordt toegepast. Zo zijn de selectiviteit, specificiteit, gevoeligheid, lineariteit, biovervuiling en zuurstofafhankelijkheid van de sensor onderzocht. Ook zijn in dit hoofdstuk enkele pilot studies gepresenteerd, zowel *in vitro* in hersenplakjes (organotypische gekweekte plakjes van de hippocampus), als *in vivo* in geanaesthetiseerde ratten. Tevens is aandacht geschonken aan het correleren van de gemeten stromen naar de vermoedelijke concentraties van glutamaat in de hersenen. De conclusie van dit hoofdstuk was dat de microsensor als analyse techniek kon worden gebruikt zowel *in vitro* als *in vivo*. Dit is in hoofdstuk 6 en 7 verder uitgewerkt.

In **hoofdstuk 6** is de sensor routinematig *in vitro* gebruikt. De invloed van verschillende farmacologische stoffen op de afgifte van glutamaat uit acute hippocampus plakjes was onderzocht. Zover wij weten is dit de eerste studie waarin extracellulaire glutamaat in hersenplakjes is gemeten met een microsensor, en dus met een dergelijke spatiële en temporele resolutie. Het bleek dat de microsensor vele specifieke voordelen had ten opzichte van de tot dan toe gebruikte methoden om glutamaat in hersenplakjes te meten. De meeste van deze analyse technieken detecteren namelijk het weglekken van glutamaat aan de buitenkant van het plakje. De fysiologische oorsprong van dergelijke glutamaat staat enigszins ter discussie, omdat deze eerst moet ontsnappen aan de actieve heropname processen voordat deze gedetecteerd kan worden. Daarentegen wordt de microsensor in het plakje zelf geïmplanterd. Als zodanig kan de afgifte van glutamaat van seconde tot seconde in de nabijheid van cellulaire activiteit veel nauwkeuriger worden gemeten. Bovendien kan de microsensor, door zijn kleine afmetingen, in een specifiek gebied naar keuze worden geplaatst. Een ander voordeel van het gebruik van microsensoren in hersenplakjes is dat de omstandigheden relatief gunstig zijn. Experimentele condities en manipulaties kunnen goed worden gecontroleerd en gestandaardiseerd en lagere concentraties van interfererende stoffen en hogere zuurstof concentraties zijn aanwezig.

In **hoofdstuk 7** is de sensor routinematig als analyse techniek *in vivo* gebruikt. Ook nu is de invloed van verschillende farmacologische stoffen op de afgifte van glutamaat onderzocht. Ook al waren de omstandigheden *in vivo* minder gunstig dan *in vitro*, de

voornamelijk wordt bemonsterd uit beschadigd hersenweefsel. De temporele resolutie heeft betrekking op de tijdsresolutie waarmee wordt gemeten. Met microdialyse wordt elke 1 tot 15 minuten een monster gemeten. Echter de neuronale processen in de hersenen vinden plaats in de orde van milliseconden tot seconden. Als gevolg hiervan zullen dergelijke processen niet worden gedetecteerd.

Om glutamaat afkomstig van neuronen te meten wordt in het ideale geval een analyse techniek gevraagd met afmetingen van enkele nanometers die glutamaat kan detecteren met een respons tijd in de orde van microseconden. Het spreekt voor zich dat een techniek met dergelijke parameters op dit moment niet bestaat. De beste benadering wordt gevormd door microsensoren.

### **Microsensoren**

Microsensoren zijn feitelijk een geminiaturiseerde vorm van biosensoren. Biosensoren bestaan al sinds 1962 en worden gedefinieerd als een combinatie van een biologisch identificatie element (bijvoorbeeld een enzym, antilichaam of eiwit), dat gekoppeld is aan een geleider. Deze geleider zet het signaal dat afkomstig is van de biologische herkenningreactie om naar een meetbaar signaal. In theorie zijn vele verschillende biosensor concepten mogelijk, echter het type biosensor waarbij een enzym gekoppeld is aan een elektrode oppervlak is verreweg de meest voorkomende variant. Dit zijn de zogenaamde amperometrische enzym biosensoren. Bij dit type sensor wordt de activiteit van een enzym omgezet in een elektrische stroom.

Een microsensor combineert aldus de selectiviteit van een enzym met de spatiële en temporele resolutie van een microelectrode. Een dergelijke sensor wordt als een veelbelovende oplossing beschouwd voor het meten van glutamaat afkomstig van neuronale processen. Sinds een jaar of tien wordt door verschillende onderzoeksgroepen gewerkt aan de ontwikkeling van een functionele glutamaat microsensor. In praktijk blijkt de ontwikkeling echter tegen te vallen. Tot nu toe zijn er nauwelijks microsensoren aanwezig die routinematig als analyse techniek gebruikt kunnen worden. Bovendien wordt veelal een veelbelovend microsensor concept gepresenteerd, waarna vervolgens niets meer van dit type onderzoek wordt vernomen. Het spreekt voor zich dat in zo'n geval vraagtekens gezet kunnen worden bij de toepasbaarheid van dergelijk onderzoek.

In het algemeen blijkt de technische ontwikkeling en het praktische gebruik van microsensoren de grootste beperkende factor in het onderzoek. Eén van de voornaamste technische problemen is de koppeling van het enzym aan de elektrode. Het cruciale punt daarbij is de overdracht van elektronen tussen het enzym en de elektrode. Verschillende elektrochemisch actieve stoffen, die tevens aanwezig zijn in de hersenen, kunnen dit proces verstoren. Om dit probleem het hoofd te bieden zijn vele verschillende typen ("generaties")

microsensor bleek *in vivo* toch ook een veelbelovende analyse techniek. Het effect van verschillende farmacologische stoffen kon duidelijk worden gemeten, waarbij veranderingen in de extracellulaire glutamaat concentratie in de orde van seconden werden gedetecteerd. Met name de waarneming dat toediening van TTX een significante daling in de basale extracellulaire glutamaat concentratie veroorzaakte was belangrijk. Dit impliceert namelijk dat de micosensor glutamaat kan detecteren afkomstig van neuronale oorsprong.

Tenslotte is in **hoofdstuk 8** de microsensor als analyse techniek kritisch geëvalueerd. De meest belangrijke aspecten met betrekking tot de constructie en applicatie van de sensor zijn bediscussieerd. Tevens is de vraag beantwoord of de microsensor techniek daadwerkelijk een verbetering vormt voor het meten van glutamaat in de hersenen. In het algemeen heeft deze slotbeschouwing een wat meer subjectief en speculatief karakter, waarbij in de discussie op duidelijke wijze stelling wordt genomen aangaande tal van aspecten die direct verband houden met het gebruik van de sensor als analyse techniek. Tenslotte zijn aanbevelingen gedaan welke aspecten in de toekomst nog nader onderzoek verdienen.



